

AUREOBACIDIUM PULLULANS STRAIN AND ITS PRODUCTION**Publication number:** JP62111681**Publication date:** 1987-05-22**Inventor:** AUGUSUTO BETSUKE; KONRAATO REHINERU;
OTSUTOO FUUBERU**Applicant:** CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND**Classification:****- International:** **C12N1/14; C12N15/00; C12N15/01; C12P19/10;**
C12R1/645; C12N1/14; C12N15/00; C12N15/01;
C12P19/00; (IPC1-7): C12N1/14; C12P19/10;
C12R1/645**- European:** C12P19/10; C12R1/645**Application number:** JP19860258693 19861031**Priority number(s):** DE19853539180 19851105**Also published as:** EP0222302 (A2)
 US5019514 (A1)
 EP0222302 (A3)
 DE3539180 (A1)
 EP0222302 (B1)**Report a data error here**

Abstract not available for JP62111681

Abstract of corresponding document: **EP0222302**

The Aureobasidium pullulans strains produce pullulan but virtually no melanin.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-111681

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)5月22日

C 12 N 1/14
C 12 P 19/10

A-6712-4B
8515-4B※

審査請求 有 発明の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 オーレオバシジウム・ブルランス菌株及びその製造方法

⑮ 特 願 昭61-258693

⑯ 出 願 昭61(1986)10月31日

優先権主張 ⑰ 1985年11月5日 ⑱ 西ドイツ(DE) ⑲ P3539180.4

⑳ 発 明 者 アウグスト・ベツケ ドイツ連邦共和国 ゲルテンドルフ、リンデン・シュトラ
ーセ 10

㉑ 出 願 人 コンソルティウム・フ ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 70、ツィールシエクツ
ユア・エレクトロケミ ト シュトラーセ 20
ツシエ・インドウスト
リー・ゲゼルシャフ
ト・ミット・ベシユレ
ンクテル・ハフツング

㉒ 代 理 人 弁理士 佐々木 清隆 外3名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

オーレオバシジウム・ブルランス菌株及びその
製造方法

2. 特許請求の範囲

1) ブルランを生産しかつメラニンの生産量が
低下したものであって、そして下記の工程、すな
わち、

(a) ブルランおよびメラニンを産生するオーレ
オバシジウム・ブルランス菌株をそれ自体公知の
方法で突然変異生成条件下に処理し、

(b) 次に、こうして突然変異条件下に処理した
菌株を、それ自体公知の方法で培養し、そして、

(c) 突然変異オーレオバシジウム・ブルランス
菌株(1個またはそれ以上のコロニーの形で)を
選択する、

ことによって得ることのできるオーレオバシジ
ウム・ブルランス菌株ならびにこれから誘導され
た菌株類であって、その選択された菌株およびその
誘導菌株の着色性が親株のそれよりも低いある

いは皆無である前記オーレオバシジウム・ブル
ランス菌株ならびにこれから誘導された菌株類。

2) UV光線での照射あるいは化学的処理、特
にメタンスルホン酸エチルでの処理による突然変
異によって得られる特許請求の範囲第1項に記載
の菌株。

3) 前記(b)工程において、細胞増殖がほと
んどないかあるいは全てないがしかし尚メラニ
ンの生成が行なわれる温度範囲、特に2~13℃の
温度範囲、好ましくは4~10℃の温度範囲で培
養を行うことにより得られる特許請求の範囲第1
項又は第2項に記載の菌株。

4) 出発菌株としてATCC 9348を使用す
ることによって得られる特許請求の範囲第1項な
いし第3項のいずれかに記載の菌株。

5) ブルランを生産し、しかもATCC 934
8よりも少量のメラニンを産生するオーレオバシ
ジウム・ブルランス菌株P56およびこれから誘
導した菌株類。

6) 前記特許請求の範囲第1項の工程(a)~

(c) を行うことから成る、前記特許請求の範囲第1～5項のいずれかに記載のオーレオバシジウム・ブルランス菌株の製造方法。

7) 前記特許請求の範囲第2、3および4に記載の方法を行う、前記特許請求の範囲第6項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ブルランを産生し実質的にメラニンを産生しないオーレオバシジウム・ブルランス (*Aureobasidium pullulans*) 菌株およびその製造方法ならびにその用途に関する。

(従来技術とその問題点)

オーレオバシジウム属の菌株がブルランを産生することは知られている。ブルランはマルトトリオース単位 (α -1-4結合) を有し、該単位が α -1-6位結合している多糖類である。(Bernier 著、「Can.J.Microbiol.」4 (1958) p. 195-204」、およびBender、LehmannおよびWallenfels著「Biochim. Biophys. Acta」36

(1959)、p. 309-316」参照。)

この多糖類ブルランは例えば下記のような種々の用途を有している。

(1) 二酸化炭素透過性であって酸素非透過性の透明フィルム製造の用途。

(2) 凝集剤としての用途。

(3) 濾出液におけるデキストラン代替物としての用途。

オーレオバシジウム属の菌株は培養中に帯緑黒色の着色物(メラニン)を生成する。このメラニンは通常のブルラン抽出においては除去することができない。従って本発明の目的の1つは、従来技術によるよりもメラニンの生成量のより少ないオーレオバシジウム・ブルランス菌株を提供することにある。本発明の他の目的は、この種の菌株の製造方法ならびに該菌株を用いてブルランを産生するという該菌株の用途を提供することにある。(問題点を解決するための手段)

従って本発明は、ブルランを産生し、かつメラニンの産生量が低下したものであって、そして下

記の工程、すなわち、

(a) ブルランおよびメラニンを産生するA、ブルランス菌株をそれ自体公知の方法で突然変異生成条件下に処理し、

(b) 次に、こうして突然変異条件下に処理した菌株を、それ自体公知の方法で培養し、そして、

(c) 突然変異A、ブルランス菌株(1個またはそれ以上のコロニーの形で)を選択する、

ことによって得ることのできるA、ブルランス菌株ならびにこれから誘導された菌株類に関するものであり、本発明におけるこの様に選択された菌株および更にそれから誘導された菌株類の着色性は親株のそれよりも低いかあるいはゼロである。

この突然変異菌株は、例えば、寒天平板培養培地上で培養することができる。選択されたコロニーは、これらが尚充分量のブルランを産生するか否かを確信するために、液体培地中で試験することができる。

本発明のA、ブルランス菌株はUV光線照射によるかあるいは化学的処理特にメタンスルホン酸

エチルでの処理によって突然変異させて得ることができる。

メラニンの生成は時々起る。培養中にメラニンを生成させ、あるいはメラニンを生成させないためには、個々のコロニーをこの段階中に一緒に成長させることなくそして細胞層を形成しないようにすることが好ましい。このためには、前記(b)工程において細胞増殖がほとんど起らないかあるいは全く起らないで尚メラニンが生成する温度範囲、特に2～13℃、好ましくは4～10℃の温度範囲で培養することができる。

親株としてATCC 9348を使用することができる。

この公知菌株からの突然変異産物の1つはA、ブルランス株P56であり、これは独国微生物委託機関に委託しており、その委託番号は、DSH 3562である。この株P56の菌学的性質は、新株ATCC 9348とは、前者が本発明の菌株はメラニンを生成しなくかつブルランの生成量が後者の新株よりも50%以上も多い点において相

異している。

本発明のA. プラランス菌株は、前記の工程 (a) ~ (c) により、そして適当な場合には前記した特定の条件下に得ることができる。

プルランは本発明のA. プラランス菌株を培地中で培養することにより、即ちプルランを培地中に生成させ、そして生成したプルランを該培地から単離することにより得ることができる。培地は菌株が利用可能な炭素源（例えば、グルコース、シュクロース、マルトース又はキシロース）ならびに酵母エキスおよび細胞成長に必須の無機塩類を含有している必要がある。通常、培養は好気条件下で、例えば20~30℃の温度で、そして例えば2.5~6のpHで震盪培養によるかあるいは通気しながら行う液内培養によって行なわれる。

本発明を下記の実施例により詳しく説明する。

実施例1

市販のA. プラランス菌株（例えばATCC 9348）を、5g/ℓの K_2HPO_4 、1g/ℓ

の $NaCl$ 、0.6g/ℓの $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2g/ℓの $MgSO_4$ 、0.4g/ℓの酵母エキスおよび30g/ℓのシュクロースを含有し、そしてHClでpHを5.5に調整したドゥイ (Le Duy) の培地中で培養する。

その菌株を該培地中で24時間培養する。次に菌糸体を6000×gで5分間遠心分離して除去する。上澄液を17,000×gで10分間再遠心分離する。この遠心分離の結果生成したペレット（小球状の菌糸塊）を生理食塩水で洗い、次に細胞密度を 1×10^7 個/㎖に調節する。次にこの懸濁液にUV光線（354nm; 1,400 μW/cm²）を7~8分間照射する。

この懸濁液（0.1㎖）を寒天培養板（300gのポテトエキスと20gのグリコースと15gの寒天/ℓ）上に2~3日間載置する。この培養板を8日間4℃に保つ。こうした後、無着色であるか、あるいは実質的に無着色であるコロニーを選択する。この選択されたコロニーにつき、これらが尚充分な量のプルランを生成するか否かを

検査する。

実施例2

次の成分から培養培地を作成する。1ℓの蒸留水、5gの K_2HPO_4 、1gの $NaCl$ 、0.6gの $(NH_4)_2SO_4$ 、0.2gの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.4gの酵母エキスおよび30gの炭素源（前記参照）。

この培地100㎖をHClでpH5.5に調節する。

次にこの培地を500㎖の三角フラスコに入れて滅菌する。次に、前記実施例1で作成した本発明の菌株P56をこの培地に接種する。培養を26℃で攪拌下（200rpm）に行う。

7日間培養後、培地を27,000×gで15分間遠心分離する。2倍量の96%エタノールを上澄液に加えて混合し、混合物を1000×gで10分間遠心分離するとその間に白色のプルランが分離してくる。生成物を洗浄し、粉碎し、水に再溶解し、エタノールで再沈澱させそして次に乾燥する。

この生成物の同質のために、これを¹³C NMR分析と高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にかける。

比較例1

実施例2と同様の操作を、但し市販のA. プラランス菌株（例えばATCC 9348）を使用して、繰り返す。生成したプルランは強い帯緑黒色に着色していた。

代理人弁理士（8107）佐々木 清隆
（ほか3名）



第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 19/10
C 12 R 1:645)

⑫発明者	コンラート・レヒネル	ドイツ連邦共和国	ミュンヘン	82、ツルネル	シュトラ
				ーセ	33
⑫発明者	オットー・フーベル	ドイツ連邦共和国	ミュンヘン	70、ブライトブルンネ	
				ル・シュトラーセ	17